

226832

P - 14.119.-

Case Nº 41223.-

226832

20 FEB. 1956



6 FEB. 1956

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de PARKE, DAVIS & COMPANY, entidad norteamericana, establecida en Joseph Campau at the River, Detroit, Michigan, Estados Unidos de América, por:

" PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UN PRODUCTO DE VACUNA
CONTRA LA POLIOMIELITIS " .-

-0-

Esta invención se refiere a productos de vacunas y a un método para la preparación de los mismos. Más particularmente, la invención se refiere a productos de vacuna contra la poliomielitis y a un método para la preparación de los mismos.

5



226832

La poliomiélitis es una enfermedad ocasionada por virus que puede ser fatal o puede producir efectos de invalidez o inutilidad transcendentales. Debido a la naturaleza de la enfermedad, el único modo eficaz de atacar el problema está en la profilaxis, esto es, en idear medios para prevenir la producción de la enfermedad. Recientemente, se ha desarrollado una vacuna contra la poliomiélitis muerta o neutralizada compuesta de virus de poliomiélitis muertos o neutralizados pero antígenos de los tipos 1, 2 y 3, la cual ha sufrido un ensayo clínico completo. Esta vacuna, aun cuando es eficaz, deja mucho que desear. Su preparación es cara, el método de preparación impide la normalización o el ajuste de la potencia, la vacuna produce reacciones y molestias al administrarla, el poder antigénico de la vacuna disminuye bastante rápidamente durante el almacenamiento, etc.

Es un objeto de la invención proporcionar productos para vacuna contra la poliomiélitis que son más estables durante el almacenamiento que los productos de vacuna contra la poliomiélitis conocidos.

Otro objeto de la invención es proporcionar productos de vacuna contra la poliomiélitis que son capaces de producir una respuesta anti-cuerpo mucho más elevada que los productos para vacuna contra la poliomiélitis conocidos.

Otro objeto más de la invención es propor-



226832

cionar productos de vacuna contra la poliomiелitis que pueden ser normalizados.

Otro objeto de la invención es proporcionar productos de vacuna contra la poliomiелitis que pueden ser preparados en cualquier potencia que se desee.

Otro objeto más de la invención es proporcionar productos de vacuna contra la poliomiелitis de una potencia comparable a los productos de vacuna contra la poliomiелitis conocidos a menor coste.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar productos de vacuna contra la poliomiелitis que producen menos reacciones al ser administrados.

De acuerdo con la invención estos y otros objetos que aparecerán más adelante se realizan adsorbiendo el antígeno del virus de la poliomiелitis de una vacuna contra la poliomiелitis acuosa, "muerta" o neutralizada que contenga por lo menos una cepa de antígeno de la poliomiелitis humana sobre fosfato de aluminio, separando el fosfato de aluminio con el antígeno de la poliomiелitis adsorbido del líquido y suspendiendo de nuevo el precipitado de antígeno y fosfato de aluminio en un medio acuoso. Variando la cantidad de medio acuoso usado para suspender nuevamente el precipitado de antígeno y fosfato de aluminio se pueden obtener productos de vacuna contra la poliomiелitis de potencia



226832

y contenido de fosfato de aluminio determinados de antemano. El contenido de fosfato de aluminio del producto de vacuna final puede también regularse variando la cantidad de fosfato de aluminio empleado para la adsorción inicial del antígeno. El antígeno de la poliomielitis contenido en los productos de la invención es mucho más estable durante el almacenamiento que el antígeno presente en las vacunas originales a partir de las cuales se han preparado los productos. Además, los productos de la invención que contienen suficientes medios de suspensión acuoso para hacer que el volumen sea igual al de las vacunas originales a partir de las cuales se han preparado los productos poseen una potencia antigénica mucho más elevada que las vacunas originales e incluso una potencia antigénica mucho más alta que los productos obtenidos por la simple adición de fosfato de aluminio a las vacunas originales. Es sorprendente que estos productos particulares de la invención posean una potencia antigénica cinco a diez veces superior a la de las vacunas originales y dos o tres veces superior a la de las vacunas originales a las cuales se ha añadido fosfato de aluminio.

Estas potencias antigénicas extremadamente altas de los productos de la invención son verdaderamente sorprendentes y de gran importancia técnica puesto que por la práctica de la invención se pueden producir cinco a diez inmunizaciones con una cantidad de vacuna igual a la que se usa actualmente en la preparación de una inmunización. Además, las cinco a diez inmunizaciones produ-



226832

5 cidas de esta manera poseen la misma potencia antigéna
que la inmunización producida por los métodos conoci-
dos. Tales productos, por ser mucho más concentrados que
las vacunas empleadas en la actualidad causan menos mo-
lestias al ser inyectados y las dosis inferiores produ-
cen aún una inmunidad comparable a la obtenida por el
empleo de las vacunas actualmente en uso. Quizás sea
todavía más sorprendente lo elevado de las potencias
antígenas de los productos de la invención que tienen
10 el mismo volúmen que la vacuna original en comparación
con las potencias antigénas de las vacunas originales
a las cuales se ha añadido fosfato de aluminio. Dichos
productos tendrían normalmente que tener la misma po-
tencia antigéna que las vacunas originales a las cuales
15 se ha añadido fosfato de aluminio. Sin embargo, como se
ha dicho anteriormente, no sucede así si bien se desco-
noce la razón del gran incremento en la potencia antigéna
producido por la separación del precipitado de antígeno y
fosfato de aluminio de la solución de vacuna original y
20 la nueva suspensión en un volúmen igual de medio acu-
so.

Los productos de la invención producen po-
ca o ninguna reacción al inyectarlos. El contenido total
de nitrógeno proteínico de los productos es muy bajo,
25 generalmente de alrededor de 0,0002 a 0,001 mg/ml. en
los productos que tienen el mismo volúmen que la vacuna
original, y la fase acuosa de los productos de la inven-



226832

ción no contiene prácticamente proteínas.

Las vacunas contra la poliomiелitis acuosas, muertas o neutralizadas usadas como materiales de partida en la producción de los productos de la invención pueden contener cualquiera de los varios tipos de virus de poliomiелitis humana o todos ellos. Las vacunas preferidas son aquellas que contienen una mezcla de los tipos 1, 2 y 3 de antígeno de virus de la poliomiелitis. Estas vacunas pueden producirse de varios modos diferentes. Por ejemplo, se puede tripsinizar tejido renal de mono macerado para quitarle los tejidos extraños; dejar que las células restantes se multipliquen; inocular el medio con el virus de la poliomiелitis; incubar la mezcla; recoger el líquido e inactivar los virus vivientes por tratamiento con formaldehido, radiaciones ultravioletas u otros medios adecuados. Si se desea, se pueden usar también las vacunas preparadas omitiendo la operación de tripsinización, pero, en este caso, el contenido proteínico de la vacuna puede que sea excesivamente alto y debe determinarse antes de su uso. En la preparación de vacunas mixtas, es decir, de vacunas que contengan más de un tipo de virus de la poliomiелitis, es costumbre reunir o mezclar los líquidos recogidos que contienen los diversos tipos después de la operación de inactivación, aunque, si se desea, esto puede hacerse anteriormente. Cuando se usan vacunas inactivadas con formaldehido es preferible emplear vacunas a las cuales no se

20



226832

haya añadido nada de bisulfito sódico para reducir el contenido de formaldehído.

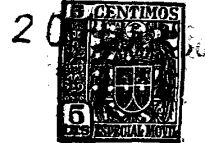
El fosfato de aluminio, el otro material de partida usado en la producción de los productos de la invención, se emplea en forma de gel. Se pueden preparar fácilmente geles de fosfato de aluminio adecuados añadiendo una solución acuosa que contenga una cantidad equivalente de un fosfato soluble en el agua, tal como fosfato sódico tribásico, a una solución acuosa que contenga una cantidad conocida de cloruro de aluminio. El gel resultante se lava con objeto de quitarle las sales inorgánicas, el gel se pone de nuevo en suspensión en agua y el pH se ajusta a aproximadamente 5,5 a 6,5. La suspensión del gel se puede esterilizar por tratamiento en autoclave y luego se determina el contenido de fosfato de aluminio por mililitro secando una pequeña muestra. La suspensión del gel normalizada se almacena después hasta que haya necesidad de usarla. Justamente antes de su uso se centrifuga una cantidad medida de la suspensión del gel para quitarla el líquido y el gel de fosfato de aluminio restante se use en la producción de los productos de la invención.

Para obtener los productos de la invención se pone en suspensión una cantidad conocida de gel de fosfato de aluminio en una cantidad medida de una vacuna contra la poliomiélitis muerta acuosa que contenga por lo menos una capa de antígeno de la poliomiélitis humana y



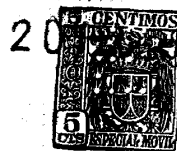
226832

preferiblemente tres. La suspensión se puede preparar a cualquier temperatura inferior a unos 40° C, pero, preferiblemente, se prepara a una temperatura comprendida entre 0 y 10° C. La suspensión resultante se agita, es decir, se sacude o menea, para asegurar la completa adsorción del antígeno, esto es la adsorción del 90 % o más del antígeno. A la temperatura ambiente (22 a 25° C.) la adsorción del antígeno es completa al cabo de una hora aproximadamente, mientras que a temperaturas inferiores la adsorción es algo más lenta. Como la ampliación del tiempo de adsorción a varias horas e incluso a varios días a temperaturas bajas (0 a 10° C.) parece que no tiene efecto perjudicial alguno sobre el poder antígeno, es preferible dejar transcurrir suficiente tiempo para lograr la adsorción completa del antígeno. En la preparación de las suspensiones de antígeno y fosfato de aluminio, la cantidad de fosfato de aluminio no es particularmente crítica. Por supuesto, debe emplearse suficiente gel de fosfato de aluminio para asegurar la adsorción completa del antígeno y por lo que ha sido posible determinar se precisa una cantidad mínima de 0,5 mg./ml. de la suspensión final para este fin. El límite superior de la concentración de fosfato de aluminio puede variarse ampliamente. Naturalmente, es preferible no usar una cantidad tan grande que el producto final contenga una cantidad excesiva de fosfato de aluminio. En la práctica se ha visto que la cantidad óptima de fosfato de aluminio a usar



226832

de lavado como en la de puesta en suspensión final,
la temperatura del medio acuoso debe mantenerse por
debajo de unos 30° C. y preferiblemente entre 0 y 10° C.
La cantidad de medio acuoso usado en la preparación del
5 producto final depende de la potencia y del contenido
de fosfato de aluminio deseados. Esto, por supuesto,
está sujeto a variación dentro de amplios límites. Sin
embargo, el volúmen del medio acuoso no debe ser tan
grande que se necesiten más de tres mililitros del pro-
10 ducto para producir una suficiente formación de anti-
cuerpos para proporcionar la inmunización. Dicho de
otro modo, cada tres mililitros de los productos deben
contener por lo menos suficiente antígeno para producir
inmunidad, Prácticamente, no existe cantidad mínima al-
15 guna de agente de suspensión exigiéndose solamente que
el material sea lo bastante fluido para poder ser inyec-
tado. En términos generales, los productos preferidos de
la invención son aquellos que contienen entre 0,2 y 8 mg/
ml. de fosfato de aluminio. La determinación previa de
20 la cantidad de agente de suspensión a usar con el fin de
producir una composición que tenga un contenido dado de
fosfato de aluminio implica solamente un cálculo sencillo.
Por ejemplo, si se usan 4 mg./ml. de fosfato de aluminio
para precipitar el antígeno de la vacuna original y se de-
25 sea un producto final que tenga un contenido de fosfato de
aluminio de 4 mg./ml., se emplea suficiente medio de sus-
pensión acuoso para obtener un volúmen final igual al de



226832

la vacuna empleada como material de partida. Tal producto contiene 4 mg./ml. de fosfato de aluminio y tiene una potencia antigéna cinco a diez veces mayor que la vacuna original. Análogamente, si se desea preparar un
5 producto final que contenga 2 mg./ml de fosfato de aluminio, entonces se emplea suficiente medio de suspensión acuoso para obtener un volumen final igual al doble del de la vacuna original, etc.

Con el fin de asegurarse de que los productos de la invención permanecen incontaminados por
10 bacterias, mohos y hongos, es preferible añadir una sustancia preservativa a los productos. La sustancia preferida para este fin es el cloruro de bencetonio que se puede emplear a una concentración de 1 a 10/000
15 a 1 a 50.000. Igualmente pueden usarse otras sustancias preservativas que carezcan de efecto perjudicial sobre el poder antigéno de los productos.

Si se desea, los productos de la invención se pueden combinar con otros productos compatibles de
20 vacunas contra bacterias y virus. Por ejemplo, se pueden combinar con productos de vacuna contra tétanos-difteria-tos ferina obtenidos adsorbiendo los antígenos antes mencionados sobre fosfato de aluminio, separando el precipitado de antígeno y fosfato de aluminio y volviendo a ponerlo en suspensión en un medio acuoso. Estos productos com-
25 binados son capaces de inmunizar contra la poliomiелitis, el tétano, la difteria y la tos ferina. En estos productos



226832

combinados, hay que tener cuidado de que la sustancia preservativa empleada no sea una sustancia que destruya el poder antigéno del antigéno de la poliomiélitis. Como el cloruro de bencetonio no afecta de modo adverso el antigéno de la poliomiélitis, es la sustancia preservativa preferida para tales productos.

La invención se ilustra por los ejemplos siguientes:

EJEMPLO 1.-

(a) Preparación de la vacuna.

Las células para el cultivo del virus de la poliomiélitis se preparan por el método de Dulbecco, Journal of Experimental Medicine, 99, pag. 167 (1954). En pocas palabras, este procedimiento consiste en preparar primeramente una suspensión de células epiteliales de riñón de mono véase Dulbecco, Proc. Nat. Acad. Sci., 38, pag. 747 (1952) por tratamiento de tejido renal macerado de monos Cynomalpus o Rhesus sanos con tripsina con objeto de quitarle las materias extrañas y dejar en libertad las células individuales. Estas células se dejan multiplicar sobre una superficie de vidrio adecuada en uno cualquiera de los diversos medios para el cultivo de tejidos. La lámina o capa de células renales cultivadas producida así se inocula luego con un cultivo de siembra del tipo 1 (cepa Mahoney) de virus de la poliomiélitis y la mezcla se incuba a 36-37° C. hasta que la destrucción de las células sea completa y hayan quedado en libertad grandes cantidades de virus nuevos. El líquido que contiene el virus se recoge y se pasa a través de una bujía de vidrio fritado ultra



20

226832

fina. El filtrado que contiene el virus de la poliomieli-
tis del tipo 1 vivo se somete a ensayo para determinar su
contenido de virus, su esterilidad bacteriana y la pure-
za de la cepa.

5 Un filtrado que contiene virus de la polio-
mielitis del tipo 2 vivo (cepa MEF-1) se prepara por el
método descrito anteriormente para la preparación del fil-
trado que contiene virus de la poliomiелitis del tipo 1.
Por el mismo método se prepara igualmente un filtrado que
10 contiene virus de la poliomiелitis del tipo 3 vivo (cepa
Saukett).

 Los virus vivos contenidos en los filtra-
dos separados se inactivan por la adición de formalde-
hido e incubación de las mezclas separadas resultantes de
15 acuerdo con el procedimiento expuesto detalladamente en
la Enmienda 2 a los Minimum Requirements of Poliomyelitis
Vaccine (requisitos mínimos de la vacuna contra la po-
liomiелitis) publicada el 20 de Mayo de 1954 por el United
States Department of Health, Education and Welfare (Depar-
20 tamento Estadounidense de Sanidad, Educación y Bienester).
No se añade nada de bisulfito sódico para neutralizar el
exceso de formaldehido. Se reúnen cantidades aproxima-
mente iguales de las vacunas de los tipos 1, 2 y 3 produ-
cidas de esta forma y la vacuna reunida resultante se usa
25 en la preparación de los productos de la invención. Una
parte alícuota de la vacuna reunida se conserva en forma
inalterada para usarla como muestra de comprobación.



226832

(b) Preparación de la suspensión de fosfato de aluminio.

5 Se añaden 1.485 ml. de una solución al 10% de cloruro de aluminio (hexahidrato), de clase para análisis, en agua destilada a 7.500 ml. de agua destilada a 37° C. Después de mezclar bien, se agregan lentamente 1.485 ml. de una solución al 15,75 % de fosfato sódico tribásico, de clase para análisis, en agua destilada a la solución de cloruro de aluminio agitando constantemente. La mezcla se diluye hasta 12.850 ml. con agua destilada a 37° C, la mezcla se agita durante cinco minutos y el pH se ajusta a 5,4-6,6 con solución de hidróxido sódico 10 N. Se deja reposar la suspensión a la temperatura ambiente (20-25° C.) de cinco a siete días. Pasado este tiempo, el precipitado sedimentado tiene un volumen de unos 6.250 ml. El líquido que sobrenada se decanta y se tira. La suspensión restante se esteriliza por tratamiento en autoclave durante dos horas a 121° C. a 1,05 - 1,25 Kg/cm² de presión de vapor y luego se deja enfriar. El pH de la suspensión esterilizada es aproximadamente de 5,5 a 5,7. Se separa una pequeña muestra de la suspensión de volumen conocido y se la evapora hasta sequedad, se pesa el residuo y se calcula la concentración de fosfato de aluminio por mililitro. En la preparación particular descrita el contenido de fosfato de aluminio de cada mililitro de la suspensión era de 12 miligramos.



20 FEB

226832

(c) Preparación del producto de vacuna.

Cien mililitros de la suspensión de fosfato de aluminio preparada en (b) se centrifugan durante diez a quince minutos a 1.500 r.p.m. El líquido que sobrenada se tira. El gel de fosfato de aluminio residual se vuelve a poner en suspensión en una cantidad suficiente de una vacuna contra la poliomiелitis mixta preparada según se ha descrito en (a) para obtener una suspensión que tenga un volúmen de 300 ml. La suspensión se agita a unos 20° C. durante 30 a 60 minutos con objeto de lograr la adsorción completa del antígeno. Este producto contiene 4 mg./ml. de fosfato de aluminio. De esta suspensión se conservan 200 ml. para usarlos como muestra de comprobación.

Los 100 ml. restantes de la suspensión de vacuna y fosfato de aluminio se centrifugan durante diez minutos a 1.500 r.p.m. El líquido que sobrenada se separa por decantación y se sustituye por un volúmen igual de solución salina equilibrada de Hank (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, pag. 328 (1949) . La mezcla se agita hasta obtener una suspensión uniforme y luego la suspensión se centrifuga durante diez minutos a 1.500 r.p.m. El líquido que sobrenada se separa por decantación y se añade un volúmen igual de solución salina equilibrada de Hank fresca al gel residual. La mezcla se agita hasta que se obtenga una suspensión uniforme. El producto obtenido de esta manera contiene 4 mg./ml. de fosfato de aluminio sobre el cual han sido adsorbidos tipos 1, 2 y 3 de anti-



226832

geno de virus de la poliomiелitis. La fase líquida de esta suspensión no contiene prácticamente proteínas. Este producto es apropiado para su uso como agente inmunizador.

5 Con el fin de comparar la estabilidad y la potencia del producto de la invención con las de la vacuna contra la poliomiелitis mixta original y también con la vacuna original a la cual se hubieron incorporado 4 mg./ml. de fosfato de aluminio, las tres muestras se calentaron a 37° C. durante cinco días. Esto equivale a unos cinco meses de almacenamiento a una temperatura de 4° C. Al final 10 del periodo de calentamiento se determinó la potencia de cada una de las muestras por el método de neutralización del suero descrito por Salk, Younger y Ward American Journal of Hygiene, 60, pag. 214 (1954) y los resultados se 15 expresaron en términos de los títulos o concentraciones medios geométricos. La Tabla 1 resume los datos de potencia de las tres preparaciones ensayadas.

En esencia, el método de ensayo consiste en 20 inocular monos Rhesus con tres dosis de 1 cc. de la vacuna a ensayar a intervalos semanales, sangrar los animales una semana después de terminado el periodo de tratamiento, preparar un suero con la sangre recogida y determinar el número de anticuerpos presentes en el suero. Esta determinación se hace diluyendo en serie o sucesivamente el suero con 25 suero salino y mezclando las partes alícuotas diluídas así obtenidas con una solución normalizada que contenga un número conocido de unidades infecciosas del tipo dado de vi-



226832

rus de la poliomiélitis. Por ejemplo, al analizar la potencia del tipo 1, se usa una solución normalizada que contiene un número conocido de unidades infecciosas de virus de la poliomiélitis del tipo 1; para los análisis de la potencia de los tipos 2 ó 3, se usa una solución normalizada de virus infeccioso del tipo 2 o del tipo 3. El punto final de la valoración es la dilución a la cual el suero contiene suficiente número de anticuerpos para neutralizar exactamente el número conocido de unidades infecciosas del virus contenidas en la solución normalizada, es decir, para combinarse con dichas unidades y hacerlas no infecciosas. En el análisis de la potencia para cada tipo de virus de la poliomiélitis se utilizan varios monos.

Los resultados obtenidos así se disponen en una forma que permita una comparación y una valuación estadística convenientes tomando el logaritmo de base 2 de la dilución en el punto final para el suero para cada mono, promediando estas cifras y tomando luego el analogaritmo del promedio así obtenido. Este analogaritmo recibe el nombre de título medio geométrico de las vacunas y, por supuesto, es diferente para cada tipo de virus presente en la vacuna. Como el título medio geométrico depende de la potencia de la solución normalizada del virus de la poliomiélitis infeccioso utilizado en el ensayo es necesario especificar el número de unidades infecciosas de virus de la poliomiélitis presentes en la solución normalizada para indicar la significación apropiada del título medio geomé-



228832

trico. El método de cálculo del título medio geométrico se expone detalladamente en la Enmienda número 2 a los Minimum Requirements of Poliomyelitis Vaccine (Requisitos mínimos de la vacuna contra la poliomielitis) a que hemos aludido anteriormente.

Tabla 1

Muestra ensayada (1)	Tipo del virus	Número de monos empleados (3)	Num. de unidades infecciosas de virus neutralizadas (2)	Título medio geométrico.
Vacuna mixta original	1	6	32	128
	2	6	45	256
	3	6	320	8
Vacuna mixta original más 4 mg./ml. de fosfato de aluminio	1	6	32	660
	2	6	45	540
	3	6	320	64
Antígeno adsorbido sobre fosfato de aluminio y puesto en suspensión en solución de Hank (ALPO ₄ conc., 4 mg./ml.)	1	6	32	1320
	2	6	45	1740
	3	6	320	51

(1) Todas las muestras se calentaron a 37° C. durante cinco días y se almacenaron a 4° C, durante la inoculación. Los monos fueron sangrados una semana después de la última ino-



226832

culación.

(2) Potencia de la solución normalizada empleada en los ensayos.

(3) Los títulos de pre-vacunación de todos los monos utilizados era menor de 1:4, es decir, que la sangre de los monos no contenía anticuerpos de la poliomiелitis pre-existent.

Según se desprende de la tabla anterior, el producto de la invención produjo aproximadamente diez veces más respuesta anticuerpo con respecto al virus de la poliomiелitis del tipo 1 que la vacuna a partir de la cual fué preparado y dos veces la respuesta anticuerpo producida por la vacuna original que contenía fosfato de aluminio. Con respecto al virus de la poliomiелitis del tipo 2, el producto de la invención produjo aproximadamente siete veces más respuesta anticuerpo que la producida por la vacuna a partir de la cual fué preparado y más de tres veces la respuesta anticuerpo producida por la vacuna original que contenía fosfato de aluminio. Con respecto al virus de la poliomiелitis del tipo 3, el producto de la invención produjo una respuesta anticuerpo por lo menos seis veces mayor que la producida por la vacuna original a partir de la cual fué preparado. En realidad, la respuesta anticuerpo de la vacuna original era tan baja con respecto al virus de la poliomiелitis del tipo 3, que, estadísticamente hablando, esta respuesta era insignificante. La respuesta anticuerpo del virus de la poliomiелitis del



226832

tipo 3 para el producto de la invención y para la vacuna original con fosfato de aluminio eran, estadísticamente hablando, aproximadamente iguales. De los resultados anteriores se deduce que la potencia del producto de la invención es muy superior, no solo a la de la vacuna original de la cual se preparó, sino también a la de la vacuna original a la cual se añadió fosfato de aluminio.

La estabilidad del producto de la invención se demuestra por los resultados expuestos en la Tabla 2

Tabla 2

Muestra ensayada	Tipo del virus	Num. de mo- nds emplea- dos (1)	Num. de unidades in- fectiosas de virus neu- tralizados (2)	Título me- dio geomé- trico
Vacuna mixta ori- ginal no calentada	1	6	32	810
	2	6	45	166
	3	6	320	51
Vacuna mixta origi- nal calentada a 37° C. durante cinco días	1	6	32	128
	2	6	45	256
	3	6	320	8
Antígeno adsorbido so- bre fosfato de alumi- nio y puesto en suspen- sión en solución de Hank (AlPO ₄ cono., 4 mg./ml.) calentada a 37° C. durante cinco días.	1	6	32	1320
	2	6	45	1740
	3	6	320	51



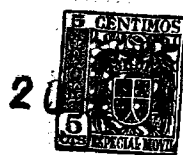
226832

(1) Los títulos de pre-vacunación de todos los monos utilizados era menor de 1:4, es decir, que la sangre de los monos no contenía anti-cuerpos de la poliomiелitis pre-existentes.

5 (2) Potencia de la solución normalizada empleada en los ensayos.

Examinando la tabla anterior se observará que la vacuna mixta original a partir de la cual se preparó el producto de la invención perdió aproximadamente 85 % de su potencia con respecto a los tipos 1 y 3 de antígenos del virus de la poliomiелitis durante el periodo de incubación, lo que fué aproximadamente equivalente a un almacenamiento durante cinco meses a 4° C. Por otra parte, el producto de la invención al final del periodo de incubación poseía de seis a diez veces la potencia de la muestra de vacuna original incubada y 1,6 a 10 veces la potencia de la vacuna original no calentada. Así, pues, el producto de la invención, luego de incubado, no solamente era muy superior a la vacuna original incubada a partir de la cual fué preparado, sino que también era muy superior en potencia a la vacuna original que no había sido sometida a ningún tratamiento de envejecimiento acelerado.

Si se desea, el producto de la invención antes preparado se puede diluir con un volumen igual de solución de Hank fría para obtener un producto de vacuna que tenga la mitad de la potencia del producto original y contenga 2 mg./ml. de fosfato de aluminio. Análogamente, por



226832

la adición de tres volúmenes de solución de Hank fría al producto de la invención se obtiene un producto de vacuna que tiene una cuarta parte de la potencia del producto no diluido y 1 mg./ml. de fosfato de aluminio. Por lo tanto, por diluciones apropiadas del producto de la invención se pueden producir productos de vacuna de potencia determinada de antemano.

Análogamente, si se desean productos que tengan una potencia superior a la del producto antes descrito, se pueden producir simplemente reduciendo el volumen de solución de Hank fría empleado en la preparación de la suspensión final del precipitado de antígeno y fosfato de aluminio. Por ejemplo, si se desea un producto que tenga una potencia doble y que contenga 8 mg./ml. de fosfato de aluminio, basta usar simplemente, en la preparación de la suspensión final del precipitado de antígeno y fosfato de aluminio, la cantidad de solución de Hank justamente necesaria para que el volumen sea de 50 ml. en lugar de de 100 ml.

Ejemplo 2.-

Se preparan aproximadamente 2.700 ml. de una vacuna contra la poliomiелitis que contenía antígeno de los tipos 1, 2 y 3 con la forma descrita en el ejemplo 1 (a). Se prepara una parte alícuota de 100 ml. de la vacuna y se añaden 0,25 ml. de una solución al 1 % de cloruro de bencetonio lentamente y con agitación eficaz a la vacuna fría. El producto resultante que contiene cloruro de bencetonio en una concentración de 1:40.000 se conserva para usarle como mues-

20



226°32

tra de comprobación.

5 Se centrifugan durante diez a quince minutos a 1.500 r.p.m. 800 ml. de suspensión de fosfato de aluminio (12 mg./ml.) preparada en el Ejemplo 1 (b). El líquido sobrenada se separa por decantación y se tira. Se añade suficiente vacuna fría contra la poliomielitis con agitación al gel de fosfato de aluminio residual para hacer que el volumen sea de 2.600 ml. La suspensión resultante se agita durante sesenta horas a 4° C. con el fin de lograr la adsorción completa del antígeno. Una parte alícuota de 100 ml. de la suspensión así obtenida se retira y se añaden lentamente con agitación a la suspensión de vacuna fría 0,25 ml. de una solución de cloruro de bencetonio al 1 %. El producto resultante que contiene 4 mg./ml. de fosfato de aluminio y cloruro de bencetonio en una concentración de 1:40.000 se conserva para uso como muestra de comprobación.

10 Los restantes 2.500 ml. de suspensión de vacuna y fosfato de aluminio se dividen en dos porciones iguales. Una porción de 1.250 ml. se centrifuga durante diez minutos a 1.500 r.p.m. y el líquido que sobrenada se saca y se tira. El residuo se vuelve a poner en suspensión en suficiente solución salina fría equilibrada de Hank para hacer que el volumen sea de 1.250 ml. Después de mezclar bien la suspensión se centrifuga durante diez minutos a 20 1.500 r.p.m. y el líquido que sobrenada se saca y se tira. El residuo se pone en suspensión de nuevo en suficiente solución salina fría equilibrada de Hank para hacer que el

20 FEB 1956



226832

volúmen sea de alrededor de 1.000 ml. y luego se añaden lentamente con agitación eficaz 3,12 ml. de una solución al 1 % de cloruro de bencetonio. La suspensión resultante se diluye hasta un volumen de 1.250 ml. con solución

5 salina fria equilibrada de Hank para obtener el producto para vacuna deseado. Este producto contiene 4 mg./ml. de fosfato de aluminio y cloruro de bencetonio en una concentración de 1:40.000. La fase acuosa del producto está prácticamente exenta de proteínas. El producto es mucho más

10 estable y posee una potencia mucho más elevada que la vacuna a partir de la cual se preparó. Es adecuado para usarlo en la inoculación de seres humanos contra la poliomiелitis. Los 1.250 ml. restantes de la suspensión de vacuna y fosfato de aluminio se centrifugan durante diez minutos a 1.500

15 r.p.m. y el líquido que sobrenada se extrae y se tira. El residuo se vuelve a poner en suspensión en suficiente solución salina fisiológica tamponada fria para hacer que el volúmen sea de 1.250 ml. Después de mezclar bien la suspensión se centrifuga durante diez minutos a 1.500 r.p.m. y

20 el líquido que sobrenada se saca y se tira. El residuo se suspende de nuevo en suficiente solución salina fisiológica tamponada fría (tampon de fosfato, pH 7,2) para hacer que el volúmen sea de alrededor de 1.000 ml. y luego se añaden lentamente y con agitación eficaz 3,12 ml. de una solución

25 al 1 % de cloruro de bencetonio. La suspensión resultante se diluye hasta un volúmen de 1.250 ml. con solución salina fisiológica amortiguada fria para obtener el producto



20 H

226832

de vacuna deseado. Este producto contiene 4 mg./ml. de fosfato de aluminio y cloruro de bencetonio en una concentración de 1:40.000. La fase acuosa del producto está prácticamente exenta de proteínas. El producto es mucho más estable y posee una potencia mucho más alta que la vacuna a partir de la cual fué preparado. Es adecuado para uso en la inoculación de seres humanos contra la poliomiélitis.

Ejemplo 3.-

Se preparan como se ha descrito en el Ejemplo 1 (a) aproximadamente 900 a 1.000 ml. de unavacuna contra la poliomiélitis que contenga antígeno de los tipos 1, 2 y 3. Se separa una parte alícuota de 100 ml. de la vacuna y se añade lentamente con agitación a la vacuna fría 1 ml. de una solución de cloruro de bencetonio al 1%. El producto resultante que contiene cloruro de bencetonio en una concentración de 1:10.000 se conserva para uso como muestra de comprobación. Otra muestra de 100 ml. se saca y se trata de una manera semejante con 0,5 ml. de una solución al 1% de cloruro de bencetonio. Esta segunda muestra de comprobación contiene cloruro de bencetonio en una concentración de 1:20.000. Se prepara una tercera muestra de comprobación partiendo de una tercera parte alícuota de 100 ml. de la vacuna añadiendo 0,25 ml. de una solución de cloruro de bencetonio al 1%. Esta muestra de comprobación contiene cloruro de bencetonio en una concentración de 1: 40.000.

Doscientos mililitros de la suspensión de fosfato de aluminio (12 mg./ml.) preparada en el Ejemplo 1(b)



226832

se centrifugan durante diez a quince minutos a 1.500 r.p.m. El líquido que sobrenada se saca y se tira. Se añade suficiente vacuna fría contra la poliomielitis, agitando, al residuo, para hacer que el volumen sea de 600 ml. La suspensión resultante se agita durante sesenta horas a 4° C. para lograr la adsorción completa del antígeno. Se prepara una muestra de 100 ml. de la suspensión y se añade lentamente con agitación 1 ml. de una solución de cloruro de bencetonio al 1% a la muestra vacuna fría. El producto resultante que contiene cloruro de bencetonio en una concentración de 1:10.000 y 4 mg./ml. de fosfato de aluminio se conserva para usarla como muestra de comprobación. Se preparan dos muestras más de comprobación partiendo de partes alícuotas de 100 ml. de la suspensión de vacuna mediante la adición de 0,5 y 0,25 ml., respectivamente, de solución de cloruro de bencetonio. Estas dos muestras de comprobación adicionales contiene cada una 4 mg./ml. de fosfato de aluminio y una contiene cloruro de bencetonio en una concentración de 1:20.000, en tanto que la otra contiene esta última sustancia en una concentración de 1: 40.000.

Los restantes 300 ml. de la suspensión de vacuna y fosfato de aluminio se centrifugan durante diez minutos a 1.500 r.p.m. El líquido que sobrenada se separa lo más completamente posible y se tira. Se añade suero salino fisiológico frío tamponado con fosfato al tiempo que se agita al residuo hasta que el volumen de la suspensión llegue a 300 ml. Después de mezclar a fondo la suspensión



228832

se centrifuga durante 10 minutos a 1.500 r.p.m., retirándose y desechándose el líquido que sobrenada. Se añade solución salina fisiológica fría tamponada con fosfato, con agitación, al residuo, hasta que el volumen de la suspensión alcanza

5 300 ml. La suspensión se divide en tres partes alícuotas de 100 ml. Se añade lentamente con agitación 1 ml. de solución de cloruro de bencetonio al 1% a una de las porciones de 100 ml. frías de la suspensión de vacuna para producir un producto de vacuna que contenga 4 mg./ml. de fosfato de alu-

10 minio y cloruro de bencetonio a una concentración de 1:10.000. De manera análoga, las otras dos porciones de 100 ml. de la suspensión de vacuna se tratan con 0,5 ml. y 0,25 ml., respectivamente, de una solución de cloruro de bencetonio al 1 %.

15 Los dos productos de vacuna producidos de esta manera contiene cada uno 4 mg./ml. de fosfato de aluminio, pero uno contiene cloruro de bencetonio en una concentración de 1:20.000 mientras que el otro contiene esta sustancia en una concentración de 1:40.000. Los tres productos de vacuna producidos como se ha descrito anteriormente son más estables y poseen una

20 potencia mucho mayor que la vacuna a partir de la cual fueron preparados o que las muestras de comprobación de la vacuna que contienen una cantidad correspondiente de cloruro de bencetonio.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Los Estados Unidos de América el 2 de Mayo de 1955, bajo el num.505.548, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25



226232

- 0 - N O T A - 0 -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España por VEINTE años, son los siguientes:

5 1º.- Procedimiento para producir un producto de vacuna contra la poliomiélitis que consiste en adsorber el antígeno del virus de la poliomiélitis de una vacuna contra la poliomiélitis acuosa muerta o neutralizada, que contenga por lo menos una cepa de antígeno de la poliomiélitis humana, sobre fosfato de aluminio, separar desde el
10 líquido el fosfato de aluminio con el antígeno de la poliomiélitis adsorbido y volver a poner en suspensión el precipitado de antígeno y fosfato de aluminio en un medio acuoso.

15 2º.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual la vacuna contra la poliomiélitis acuosa muerta o neutralizada empleada como material de partida contiene antígeno de la poliomiélitis de los tipos 1, 2 y 3.

20 3º.- Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones anteriores en el cual se añade suficiente gel de fosfato de aluminio a la vacuna contra la poliomiélitis



226032

acuosa muerta o neutralizada para producir una suspensión que contenga 0,5 a 25 mg./ml. de fosfato de aluminio, la mezcla se agita hasta que la adsorción del antígeno sobre el fosfato de aluminio sea completa, el precipitado de antígeno y fosfato de aluminio se separa de la solución y el precipitado de antígeno y fosfato de aluminio se pone nuevamente en suspensión en un medio acuoso.

4^a.- Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones anteriores en el cual la adsorción inicial se realiza a una temperatura inferior a 40° C. y la re-suspensión del precipitado de antígeno y fosfato de aluminio se realiza a una temperatura inferior a 30° C.

5^a.- Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 3 y 4 en el cual el precipitado de antígeno y fosfato de aluminio re-suspendido se separa del medio acuoso y se pone una vez más en suspensión en un medio acuoso.

6^a.- Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual el medio acuoso empleado para la resuspensión del precipitado de antígeno y fosfato de aluminio es agua o una solución salina fisiológica.

7^a.- Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual el precipitado de antígeno y fosfato de aluminio se re-suspende finalmente en suficiente medio acuoso para producir un producto de vacuna contra la poliomielitis que contenga entre



226832

0,2 y 8 mg./ml. de fosfato de aluminio.

8º.- Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual se añade suficiente cloruro de bencetonio al producto final para producir un producto de vacuna contra la poliomielitis que contenga cloruro de bencetonio en una concentración comprendida entre 1 a 10.000 y 1 a 50.000.

9º.- Procedimiento para producir un producto de vacuna contra la poliomielitis.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 20 FEB. 1956

P. A.
[Handwritten signature]